



**FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Monografia de Investigação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

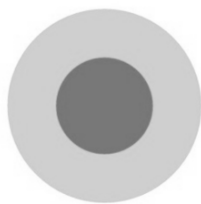
**COLONIZAÇÃO MICROBIANA EM DOIS TIPOS DE *BRACKETS*
EM PACIENTES COM APARELHO ORTODÔNTICO FIXO**

Susana Maria Pereira Cerqueira

Orientador: Mestre Eugénio Joaquim Pereira Martins

Co-orientadora: Doutora Ana Cristina Ramos Sampaio

Porto 2013



**FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Monografia de Investigação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

**COLONIZAÇÃO MICROBIANA EM DOIS TIPOS DE *BRACKETS*
EM PACIENTES COM APARELHO ORTODÔNTICO FIXO**

Susana Maria Pereira Cerqueira

Orientador: Mestre Eugénio Joaquim Pereira Martins

Co-orientadora: Doutora Ana Cristina Ramos Sampaio

Porto 2013

Autora:

Susana Maria Pereira Cerqueira
Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária na Faculdade de Medicina
Dentária da Universidade do Porto

Susana.mpc@hotmail.com

Mimd08007@fmd.up.pt

Orientador:

Eugénio Joaquim Pereira Martins
Mestre em ortodontia pela Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
Assistente Convidado da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Co-orientadora:

Ana Cristina Ramos Sampaio
Doutorada em Ciências Biológicas-Microbiologia pela Universidade de Trás-os-Montes
e Alto Douro
Professora Auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

“Tudo vale a pena se a alma não é pequena”

Fernando Pessoa em “Mar Português”

Agradecimentos

Ao Mestre Eugénio Martins pela excelente orientação, pela excelência de ensino, pela dedicação, por todos os conselhos, por me ter inculcido o enorme gosto pela ortodontia e por ser um grande exemplo a nível profissional.

À Prof. Doutora Ana Sampaio pela dedicação, pelo apoio e ajuda incondicionais, pela disponibilidade, por todos os conhecimentos transmitidos durante o tempo que partilhamos na elaboração do estudo.

À Prof. Benedita Maia pela disponibilidade, por todo o saber e gosto transmitidos pela microbiologia e, em especial, por ter amavelmente cedido o seu material e espaço de trabalho para elaboração da fase laboratorial do estudo.

À Mestre Luzia Gonçalves pela motivação ao longo deste percurso.

A todos os docentes desta instituição pela excelência de ensino.

Aos meus pais a quem devo tudo, em especial a liberdade que sempre me deram para crescer, não só pessoalmente como também profissionalmente, e pelo exemplo de dedicação, perseverança e espírito de sacrifício.

À minha irmã e madrinha, Maria José Cerqueira, por ser um dos grandes pilares da minha vida, por todo o apoio, principalmente nestes cinco anos, e por ter sido uma segunda mãe para mim.

À tia Glórinha e ao tio Ernesto Porto Soares pelo afeto que sempre demonstraram e por serem o melhor exemplo de que não são necessários laços de sangue para se poder chamar a alguém “família”.

Ao Pedro por todo o apoio, ajuda, motivação na produção deste trabalho, pelo carinho, pela paciência e por me ter ouvido nos momentos de maior desespero.

À Helena Gonçalves pela enorme amizade, por ter feito da sua casa a minha casa e da sua família a minha família durante estes cinco anos, pela incondicional ajuda durante a elaboração deste estudo e todo o curso, pelos momentos partilhados e por me ter ouvido mais do que qualquer outra pessoa.

À Maria, à Cláudia, à Clara e à Diana pelo companheirismo, pelas gargalhadas e bons momentos que partilhamos durante estes cinco anos. Nada teria sido igual sem elas!

À Marta Sousa, ao Tiago Português e à Sandra Fagundes pela amizade de anos, por terem entendido as minhas ausências durante este percurso académico e por serem tão fundamentais para mim.

À praxe e aos praxistas desta casa, em especial à Patrícia Igreja e aos meus afilhados, com quem aprendi a capacidade de manter a *cabeça fria* em situações de maior pressão e por me terem dado a oportunidade de levar da FMDUP muito mais do que um diploma.

À Mafalda Braz José, Marta Magalhães e Inês Mota pela ajuda nos procedimentos laboratoriais.

À Inês e ao Miguel por todos os momentos bem passados no Lusco Fusco e por animarem os meus dias, mesmo os mais cinzentos.

SIGLAS E ABREVIATURAS

UFC	Unidades Formadoras de Colónias
spp.	Espécies
FMDUP	Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S.sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
T.	Meio líquido Thioglicolato da Frilabo, Lda
Brucela S agar	Meio sólido pré-fabricado Brucela + H + K da Frilabo, Lda
Tryptic Soy agar	Meio sólido pré-fabricado Tryptic Soy agar da Frilabo, Lda
Columbia Agar	Meio sólido pré-fabricado Columbia CNA Agar (Sheep Blood 5%) da Frilabo, Lda
Chromo Candida agar	Meio sólido pré-fabricado Candida Chromogenic da Biogerm, S. A.
ACP	Análise de Componentes Principais

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos	Conteúdo	Página
I	Apreciação da Comissão de Ética	31
II	Explicação do Estudo aos Participantes	35
III	Declaração de Consentimento Informado	41
IV	Protocolo de Higiene oral	45
V	Recibos do Material	49
VI	Declaração de Autoria do Trabalho e Parecer do Orientador	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico	Conteúdo	Página
Gráfico1	Colonização média ($n = 2 \pm DP$) no meio Columbia agar (log UFC/por tipo de <i>bracket</i>).	10
Gráfico2	Colonização média ($n = 10 \pm DP$) no meio Columbia agar (log UFC/por tipo de <i>bracket</i>).	10
Gráfico3	Colonização média ($n = 2 \pm DP$) nos meios sólidos Tryptic Soy (<i>Actinomyces</i> spp.) e Brucela S agar (<i>P. intermédia</i> e <i>P. gingivalis</i>), em aerobiose e anaerobiose, respetivamente.	12
Gráfico4	Colonização média ($n = 10 \pm DP$) nos meios sólidos Tryptic Soy (<i>Actinomyces</i> spp.) e Brucela S agar (<i>P. intermédia</i> e <i>P. gingivalis</i>), em aerobiose e anaerobiose, respetivamente.	13
Gráfico5	Colonização média de todos os microrganismos no primeiro e segundo quadrante.	14
Gráfico6	Representação da análise das componentes principais da colonização microbiana nos <i>brackets</i> em cinco participantes.	16

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Conteúdo	Página
Tabela1	Análise da variância (ANOVA one-way) da colonização nos <i>brackets</i> nos meios sólidos Brucela S agar e Columbia. Tukey-HSD – “honest significant difference”	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Conteúdo	Página
Figura1	<i>Bracket Orthos™</i>	6
Figura2	<i>Brackets Damon® 3MX</i>	6
Figura3	<i>Brackets</i> em meio T.	7
Figura4	Colonização microbiana de uma placa de Petri do meio Columbia agar.	9
Figura5	Colonização microbiana de uma placa de Petri do meio Columbia agar.	9
Figura6	Colonização microbiana de uma placa de Petri do meio Brucela S agar.	11
Figura 7	UFC de <i>Actinomyces spp</i> em meio sólido Tryptic Soy.	11

ÍNDICE

Resumo	1
Palavras-chave:	1
Abstract.....	2
Key-words:.....	2
Introdução	3
Material e Métodos	5
1. População	5
1.1. Constituição e caracterização da amostra	5
2. Microrganismos	5
3. Metodologia.....	6
3.1. Considerações éticas	6
3.2. Fase Clínica	6
3.3. Fase Laboratorial.....	7
4. Tratamento Estatístico	8
Resultados.....	9
1. Microrganismos Cariogénicos	9
2. Microrganismos patogénicos periodontais	11
1. Participante	13
Discussão	17
Conclusão	25
Bibliografia.....	26
Anexos.....	29

RESUMO

Introdução: Os aparelhos ortodônticos funcionam como retentores adicionais de microrganismos potencialmente capazes de formar biofilme. Ocorre uma mudança quantitativa e qualitativa do mesmo aumentando o número de microrganismos cariogênicos e patogênicos periodontais.

Objetivos: Avaliar se a colonização por microrganismos em *brackets* auto-ligáveis e *brackets* convencionais de aparelhos ortodônticos fixos é diferente nas mesmas condições de utilização e higiene oral.

Material e Métodos: Os participantes foram cinco pacientes da clínica de ortodontia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto em tratamento ortodôntico ativo. Estudou-se a colonização de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinomyces* spp., *Candida albicans*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mutans*. Colaram-se 2 *brackets* auto-ligáveis e 2 *brackets* convencionais na maxila de cada paciente, sendo retirados trinta dias depois. Fez-se a coloração de Gram e inoculação nas placas dos meios seletivos. As placas em aerobiose foram observadas diariamente até aos cinco dias e em anaerobiose após sete dias de incubação, contaram-se as unidades formadoras de colónia. Utilizou-se o Microsoft Excel[®] 2007 para a análise comparativa da amostra e os testes ANOVA e Man-Whitney para a análise estatística.

Resultados: Obteve-se uma contagem média de unidades formadoras de colónia superior para todos os microrganismos nos *brackets* auto-ligáveis quando comparados com os convencionais. Estes valores não foram estatisticamente significativos. Apenas a variabilidade inter-participante teve significância

Conclusões: Parece não existir diferenças estatisticamente significativas na colonização microbiana por parte dos *brackets* auto-ligáveis e convencionais, quando estudado o parâmetro tipo de *bracket*. No entanto, conseguimos encontrar uma tendência para uma maior colonização por parte dos primeiros, sugerindo-se assim que, em estudos futuros, se aumente a amostra para eliminar o fator variabilidade inter-participante.

Palavras-chave: *Brackets* Auto-ligáveis, Biofilme Dentário, Ortodontia, Periodontologia, Microbiologia, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces* spp., *Candida albicans*

Abstract

ABSTRACT

Introduction: The orthodontic brackets work as additional retainers of microorganisms, which have the ability to form biofilm. A change occurs in the qualitative and quantitative constitution of biofilm increasing the number of cariogenic and periodontal pathogens

Objective: To assess if the auto-binded brackets and the conventional brackets colonizations by microorganisms are different, for the same conditions of oral hygiene and use.

Materials and Methods: To study five patients already enrolled in orthodontic treatment at the orthodontic clinic of Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. It was studied the colonization of *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Actinomyces* spp., *Candida albicans*, *S. sanguis* and *S. mutans*. Two auto-binding brackets and two conventional brackets were binded in the superior arcade of each patient, and then removed, thirty days after. The samples were stained with Gram coloration and inoculated in selective culture media. The plaques inoculated in aerobiosis were observed seven days after incubation, and the colony forming units were counted. It was used the Microsoft Excel® 2007 for the comparative analysis of the samples and the ANOVA and Man-Whitney tests for statistical analysis.

Results: The average counts of UFC obtained were superior in the auto-binding brackets, for all the microorganisms, when compared to the conventional brackets. However, these differences weren't statistically proven. We only found statistical significance for the study of interpatient variation.

Conclusion: It seems that there are no differences concerning the form parameter between the auto-binding and the conventional brackets. However, there was found a tendency to greater colonization of the first ones suggesting that more studies should be performed, with more samples, so that the interpatient variation could be eliminated.

Key-words: Self Ligating *Brackets*, Dental Biofilm, Orthodontic, Periodontology, Microbiology, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces* spp., *Candida albicans*

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se verificado um crescente aumento da procura de tratamentos ortodônticos. Tal deve-se não só a motivos funcionais, mas principalmente à elevada exigência da sociedade atual, onde a estética se impõe como “quase” uma necessidade básica (1). No entanto, convém ressaltar que, como em qualquer procedimento médico, o tratamento ortodôntico fixo acarreta alguns riscos. Vejamos: o uso de *brackets* potencializa a formação de biofilme dentário, na medida em que dificulta a higiene oral favorecendo a acumulação de placa bacteriana. Tal facto leva a uma mudança quantitativa e qualitativa da mesma, proporcionando um número mais elevado de microrganismos cariogénicos e patogénicos periodontais, mesmo em pacientes com uma boa higiene oral, refletindo-se num aumento da incidência e progressão da doença periodontal e lesões de desmineralização do esmalte (1-29).

Assim, sendo o biofilme o principal fator etiológico para a formação de cárie, gengivite e doença periodontal, o paciente deverá proceder a uma meticulosa higiene oral aquando da colocação da aparelhagem fixa, cabendo ao ortodontista a responsabilidade de explicar e motivá-lo para tal (6, 20-22, 30-33).

O biofilme dentário é uma biomassa densa, não calcificada, bem estruturada, uma matriz biológica ativa, composta por uma comunidade microbiana sésil, componentes salivares e material extra-celular (polímeros de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos), depositado sobre uma superfície sólida e apresentando crescimento contínuo (20, 30, 33, 34).

Os microrganismos pioneiros na colonização da superfície dentária são predominantemente aeróbios facultativos Gram-positivos, nomeadamente *Streptococcus* spp., que se ligam à película aderida presente na superfície dentária, à mucosa jugal, aos implantes dentários e aparelhos ortodônticos, sendo estes, posteriormente, seguidos por um aumento de *Actinomyces* spp. (14, 30, 34-38). Com a maturação do biofilme, apesar de existir muito oxigénio no meio oral, forma-se um gradiente de oxigénio que suporta o crescimento de uma grande diversidade de microrganismos uma vez que os aeróbios colonizam a superfície do mesmo e utilizam rapidamente o oxigénio. Forma-se um ambiente microaerofílico/anaeróbio, o qual permite a colonização por parte de microrganismos Gram-negativos anaeróbios. É nesta fase que começam a fazer parte da constituição do biofilme as espécies *Prevotella intermedia* e *Prevotella loescheii*, *Capnocytophaga* spp., *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* (6, 30, 34, 35, 39).

Introdução

Atualmente considera-se que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* estão envolvidos no início do processo de cárie, seguindo-se as espécies de *Lactobacillus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp. e *Atopobium* spp. (1, 11, 24, 36, 38-41).

Quanto à doença periodontal, as principais espécies envolvidas são *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Campylobacter*, *Fusobacterium*, e *Prevotella nigrescens*, sendo que estes microrganismos podem ser encontrados também na placa supra-gengival (4, 20, 22, 35-37, 42).

A vasta flora microbiana da cavidade oral, na sua maioria, é constituída por microrganismos comensais e, numa pequena parte, por oportunistas como é o caso da *Candida albicans* (30).

As características clínicas e as propriedades físicas de cada dispositivo ortodôntico podem influenciar a adesão da placa bacteriana e o desenvolvimento do biofilme (1, 9, 15, 22, 24, 43). Os *brackets* auto-ligáveis têm um sistema de abertura e fecho, que permite ao arame deslizar livremente, reduzindo o atrito entre *bracket*-arame, distanciando-se, assim, das convencionais ligaduras elásticas e metálicas. Esta característica é também a grande responsável pelas vantagens atribuídas a estes *brackets*, a saber: movimentação ortodôntica mais rápida, redução do tempo de tratamento para o fechamento mecânico de espaços, diminuição da infecção cruzada e melhor higienização por parte do paciente (4, 6, 9, 10, 40).

Apesar de não ser consensual se a aderência microbiana e o desenvolvimento do biofilme diferem quando são utilizados *brackets* auto-ligáveis ou convencionais, existem estudos que referem que os auto-ligáveis causam uma alteração na colonização pelas bactérias anaeróbias. No entanto, também há quem defenda que, pelas suas características físicas, os referidos *brackets* permitem uma melhor higienização por parte do paciente e menor retenção de placa e, consequentemente, menor colonização microbiana (6, 9, 10, 44).

O objetivo principal deste estudo é verificar se existem diferenças significativas na colonização de microrganismos em *brackets* auto-ligáveis e *brackets* convencionais de aparelhos ortodônticos fixos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. População

Foram selecionados pacientes da clínica de ortodontia da FMDUP, em tratamento ortodôntico ativo com aparelho fixo que se disponibilizaram para fazerem parte do estudo.

A parte clínica da investigação foi realizada por um especialista em ortodontia pela Ordem dos Médicos Dentistas.

1.1. Constituição e caracterização da amostra

Foram incluídos no estudo cinco pacientes da clínica de ortodontia da FMDUP, em tratamento ortodôntico ativo com aparelho fixo, de ambos os sexos (2 do sexo masculino e 3 do sexo feminino), com idades compreendidas entre os 13 e os 27 anos, com um bom estado de saúde geral, que não tivessem tomado antibióticos, nem usado colutório nos três meses anteriores ao início do estudo, sem tártaro e motivados para uma boa higiene oral.

Os pacientes foram abordados durante uma consulta de controlo na clínica de ortodontia.

2. Microrganismos

Estudou-se a colonização dos seguintes microrganismos:

- a) Anaeróbios/microaerofílicos: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Actinomyces* spp.
- b) Aeróbios: *S. mutans*, *S. sanguis* e *Candida albicans*.

3. Metodologia

3.1. Considerações éticas

O protocolo do estudo foi posto à consideração da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, tendo obtido um parecer favorável (ANEXO I).

Foi explicado aos pacientes todo o protocolo, reiterando que a sua participação era voluntária, podendo os mesmos abandonar o estudo a qualquer momento sem qualquer tipo de penalização, obtendo-se a sua autorização assinando um consentimento informado (ANEXOS II e III).

3.2. Fase Clínica

Recolaram-se 4 *brackets* na maxila de cada um dos 5 participantes, 1 *bracket* convencional (Orthos™ (Ormco-Sybron Dental Specialties)) no dente 15 e 24 e 1 *bracket* auto-ligável no dente 14 e 25 (Damon® 3MX (Ormco-Sybron Dental Specialties)).

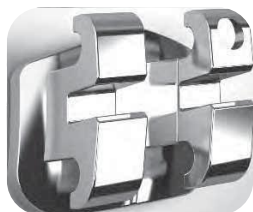


Figura 1: *Bracket* Orthos™



Figura 2: *Brackets* Damon® 3MX

Na mesma consulta, antes da recolagem, explicou-se aos participantes um protocolo de higiene oral que deveriam seguir durante os 30 dias subsequentes, tendo-lhes sido, para o efeito, fornecido um kit de higienização. (ANEXOIV).

Realizou-se também, anteriormente às recolagens dos *brackets*, uma destartarização bimaxilar.

Após 30 dias de terapêutica, os participantes compareceram a uma nova consulta, sendo-lhes questionado se, durante esse período de tempo, lhes tinham sido administrados antibióticos e se haviam cumprido o protocolo estabelecido, tendo sido unânime a colaboração.

Os *brackets* foram retirados e substituídos por equivalentes, sendo imediatamente tratados para cultivo de modo a avaliar a colonização microbiana.

3.3. Fase Laboratorial

Aquando da colheita, em condições de assepsia, os *brackets* foram colocados em tubos de ensaio com 10 mL de meio tioglicolato (T.), para o transporte até ao laboratório, tendo sido este feito rapidamente.

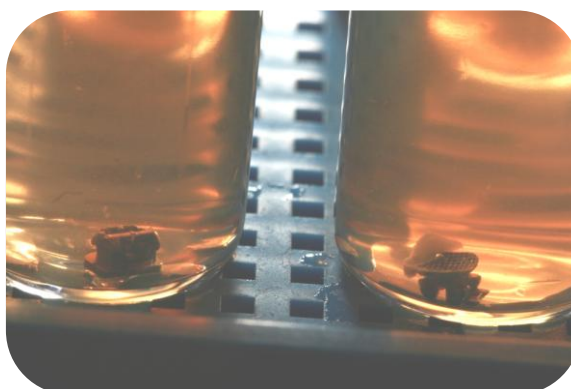


Figura3: *Brackets* em meio T.

No laboratório, os tubos foram sonicados a uma potência de 35 KHz durante 3 minutos e agitados no vórtex durante 1 minuto antes das diluições decimais em série (de 10^{-1} a 10^{-5}) (1, 32).

Material e Métodos

A inoculação nas placas de Petri dos meios seletivos pré-fabricados (Tryptic Soy agar- *Actinomyces* spp., Columbia agar- *Streptococcus* spp., Chromo Candida agar- *Candida albicans* e Brucela S agar- *P. intermedia* e *P. gingivalis*) não excedeu os 15 minutos, no caso dos anaeróbios. Posteriormente, as mesmas foram incubadas em estufa a 37°C. As condições de anaerobiose foram conseguidas usando sacos de anaerobiose, contendo geradores e indicadores de anaerobiose, de acordo com o fabricante (GENbag Anaer da bioMérieux, Lda.).

Observaram-se as placas em aerobiose diariamente até aos 5 dias, enquanto as que se encontravam em condições anaeróbias foram observadas após 7 dias de incubação.

Contaram-se as unidades UFC, cujos resultados foram apresentados como o número de UFC por *bracket*, e registadas as características coloniais de modo a identificar presuntivamente os isolados.

Efetuuou-se também a coloração de Gram ao esfregaço de cada suspensão microbiana correspondente à diluição 10^{-1} .

4. Tratamento Estatístico

Para testar se os níveis de colonização variam com o tipo de *bracket* usado (convencionais *versus* auto-ligáveis) foi efetuada a análise da variância (ANOVA). Unicamente foi possível analisar por este método os dados obtidos nos meios sólidos Columbia agar e Brucela S agar, por respeitarem a assumpção da normalidade (teste de Shapiro-Wilks). Os restantes resultados, foram resilientes às várias tentativas de normalização dos dados (\sqrt{x} ; $\log(x + 1)$), pelo que foram usados métodos não paramétricos – Kruskal-Wallis ou Man-Whitney. Também se testou os fatores localização do *bracket* (1º Quadrante *versus* 2º Quadrante) e a origem do *bracket* (5 participantes).

O conjunto de todos os dados obtidos por participante foi analisado por um método multidimensional, ACP. Esta análise permite a ordenação das amostras, após determinar os fatores mais importantes e que melhor explicam a variância entre as mesmas. Todas as análises foram efetuadas no programa STATISTICA, versão 9.1 (45).

RESULTADOS

1. Microrganismos Cariogénicos

Entre os vários microrganismos cariogénicos, encontram-se as espécies *S. mutans* e *S. sanguis*. Estas espécies são facilmente cultivadas no meio Columbia agar.



Figura 4, 5: Colonização microbiana de uma placa de Petri do meio Columbia agar. A seta azul representa UFC *S. mutans* e a seta verde UFC *S. sanguis*

A colonização por bactérias cultiváveis nos *brackets* foi quantificada por participante e por tipo de *bracket* (Gráfico 1). É facilmente observável que a colonização varia bastante em função do participante. O participante 5 obteve os valores médios mais elevados para ambas as espécies de *Streptococcus* e nos dois tipos de *brackets*. Em geral e para o mesmo participante, a colonização foi superior nos *brackets* auto-ligáveis quando comparados com os convencionais – veja-se os participantes 1, 3 e 4. Podemos também depreender que o número de *S. mutans* foi superior ao *S. sanguis* nos dois tipos de *brackets* referidos.

Resultados

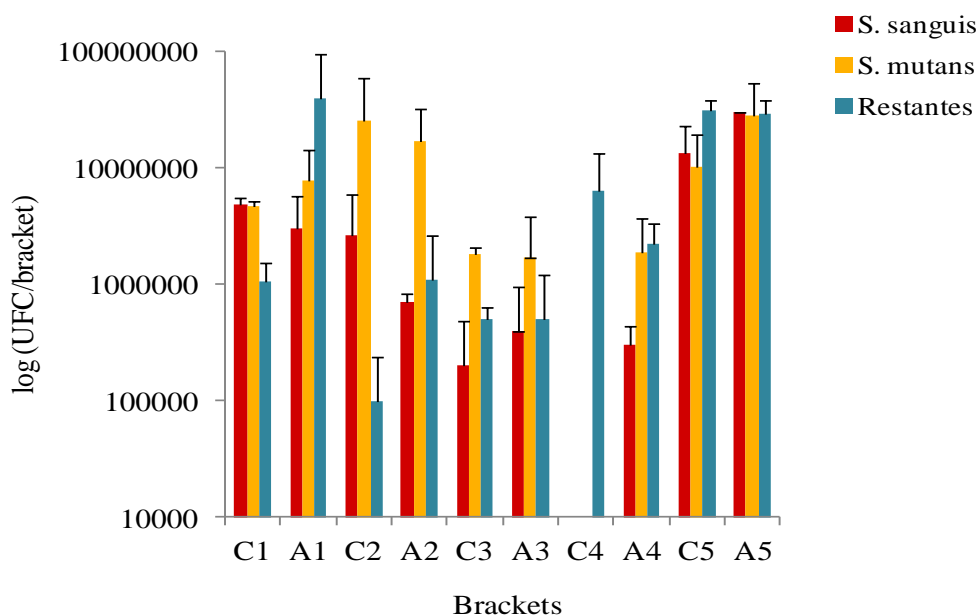


Gráfico 1: Colonização média ($n = 2 \pm DP$) no meio Columbia agar (log UFC/por tipo de *bracket*). C – *bracket* convencional; A – *bracket* auto-ligável; os números correspondem ao participante.

A tendência de uma maior colonização bacteriana nos *brackets* auto-ligáveis do que nos convencionais é mais evidente quando determinamos a média dos 5 participantes (Gráfico 2).

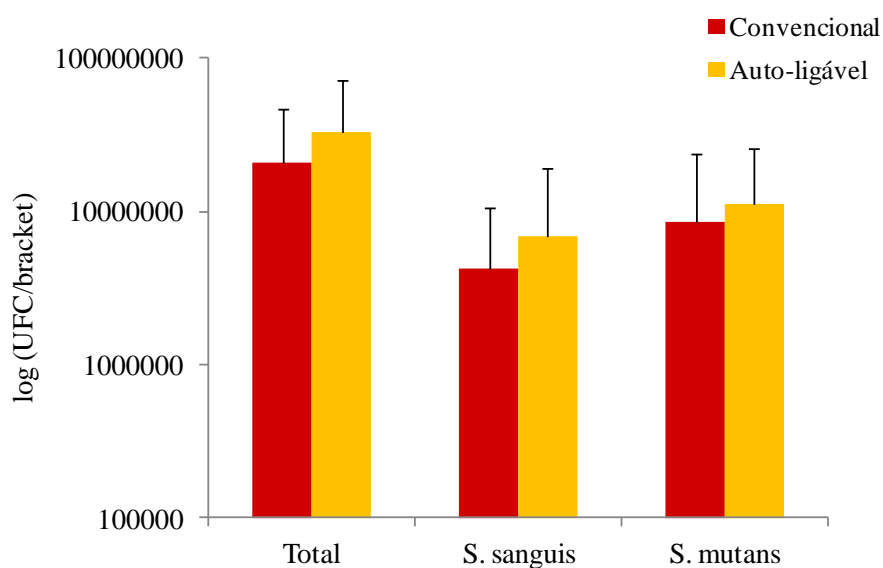


Gráfico 2: Colonização média ($n = 10 \pm DP$) no meio Columbia agar (log UFC/por tipo de *bracket*).

2. Microrganismos patogênicos periodontais

Entre os vários microrganismos patogênicos periodontais, encontram-se várias espécies *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Actinomyces* spp. e a *Treponema*.

Os microrganismos estudados foram a *P. intermedia* e a *P. gingivalis* que crescem no meio Brucela S agar.

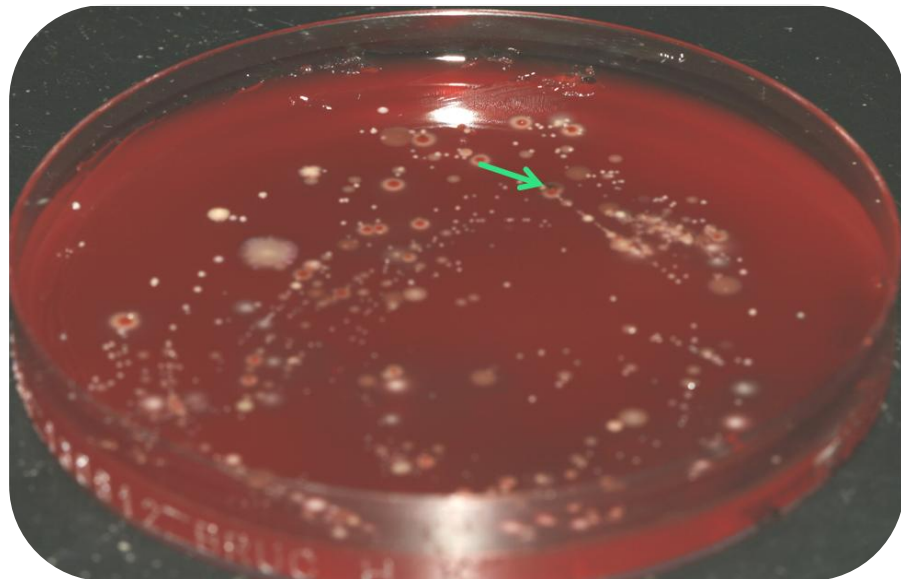


Figura 6: Colonização microbiana de uma placa de Petri do meio Brucela S agar. Seta verde representa UFC *P. intermedia*

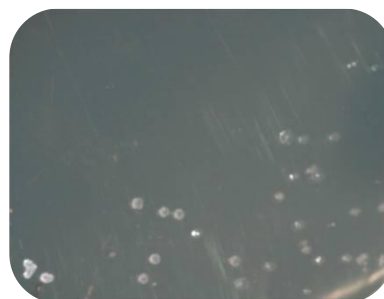


Figura 7: UFC *Actinomyces* spp. em meio sólido Tryptic Soy

Resultados

A colonização por algumas destas bactérias foi quantificada em cada *bracket* (Gráfico 3). Nos participantes 1 e 2 foi detetada a presença de *P. intermedia* e *P. gingivalis*. Nestes participantes, também se observou o “efeito tipo de *bracket*” – nos auto-ligáveis os valores médios destas espécies aumentam, no mesmo participante, nos *brackets* auto-ligáveis. *Actinomyces* spp. atinge valores elevados em alguns dos participantes (1, 2 e 5) e, em geral, superiores nos *brackets* auto-ligáveis.

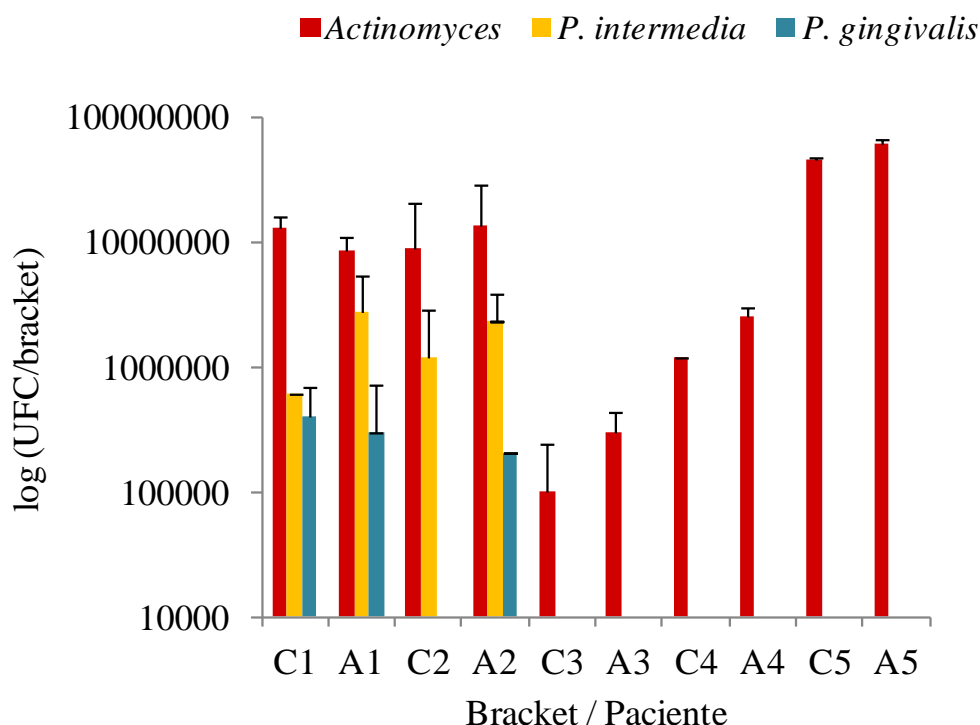


Gráfico 3: Colonização média ($n = 2 \pm DP$) nos meios sólidos Tryptic Soy (*Actinomyces* spp.) e Brucela S agar (*P. intermedia* e *P. gingivalis*), em aerobiose e anaerobiose, respetivamente. C – *bracket* convencional; A – *bracket* auto-ligável; os números correspondem ao participante.

Tal como para o meio Columbia, a colonização microbiana parece ser maior nos *brackets* auto-ligáveis do que nos convencionais no caso de *P. intermédia* (Gráfico 4).

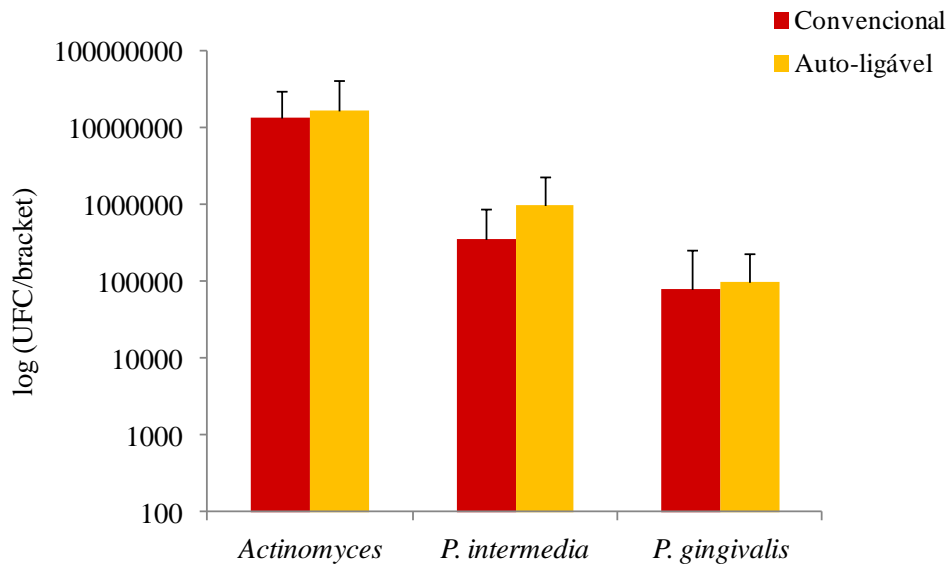


Gráfico 4: Colonização média ($n = 10 \pm DP$) nos meios sólidos Tryptic Soy (*Actinomyces* spp.) e Brucela (*P. intermédia* e *P. gingivalis*), em aerobiose e anaerobiose, respetivamente.

1. Participante

Além da colonização microbiana variar por participante, foi igualmente avaliado se existia variação na média de UFC dependendo do quadrante em que os *brackets* estivessem inseridos. Nos participantes 1, 2, 3 e 4 a contagem de UFC no meio Columbia agar foi sempre superior no 2º quadrante.

Quanto ao meio Tryptic Soy o número UFC foi sempre semelhante para os dois quadrantes, ressalva feita para o participante 3, em que se verificou um aumento no segundo quadrante.

Resultados

Relativamente ao meio Brucela S agar, em geral, observou-se um aumento no segundo quadrante, sendo esta diferença menos acentuada nos participantes 4 e 5.

No participante 5 registou-se os valores muito similares entre o primeiro e o segundo quadrante em todos os meios. Pelo contrário, no participante 3 obtiveram-se as maiores discrepâncias entre os 2 quadrantes para os diferentes meios.

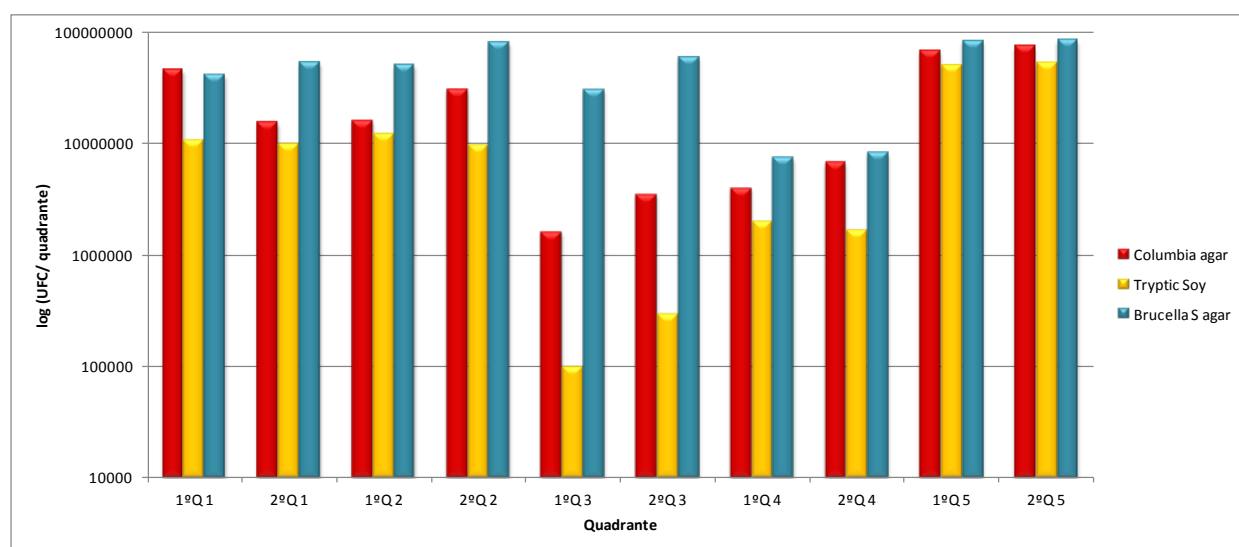


Gráfico5: Colonização média de todos os microrganismos no primeiro e segundo quadrante

Como somente os dados totais obtidos nos meios Brucela S agar (dados não transformados) e Columbia agar (dados transformados $\log(x+1)$) é que apresentaram distribuição normal, foram estes os analisados por métodos paramétricos. Tendo como fatores independentes “participante”, “tipo de *bracket*” e “quadrante”, foi efetuada uma ANOVA-fatorial. A combinação dos fatores não foi significativa ($p > 0,05$) para nenhum dos dois meios. Assim, cada fator foi analisado individualmente (ANOVA one-way) e, seguindo-se no caso do fator “participante” uma análise post-Hoc (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise da variância (ANOVA one-way) da colonização nos *brackets* nos meios sólidos Brucela S agar e Columbia. Tukey-HSD – “honest significant difference”

Meio	Fator	Valor F	Valor p	Tukey-HSD
Brucela S agar	Participante	5,101	0,009	4 ≠ 2 e 4 ≠ 5
	Tipo <i>bracket</i>	1,400	0,252	
	Quadrante	0,869	0,363	
Columbia	Participante	6,611	0,003	3 ≠ 5 e 4 ≠ 5
	Tipo <i>bracket</i>	0,358	0,557	
	Quadrante	0,255	0,619	

As restantes variáveis, como a contagem presumida das UFC/*bracket* de *S. mutans*, *S. sanguis*, *Actinomyces* spp., *P. intermédia* e *P. gingivalis*, foram analisadas pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney. Para todas as variáveis e fatores testados, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$).

A ACP dos dados da colonização (Gráfico 6) mostrou que os dois eixos principais explicam 77,24 % da variância total dos dados. Correlacionados negativamente com o fator 1 estão os valores totais de UFC obtidos nos meios sólidos Columbia agar, Tryptic soy e Brucela S agar, bem como as contagens de presumidos *S. mutans* e *S. sanguis*. Correlacionados positivamente com o eixo 2, estão as contagens de presumidos *P. intermedia* e *P. gingivalis*. Os participantes que se distribuem nos quadrantes esquerdos (1, 2 e 5) são os que apresentam maior colonização nos *brackets*, contrariamente aos participantes 3 e 4, no quadrante inferior direito. *P. intermedia* e *P. gingivalis* contribuem fortemente para a dispersão das amostras ao longo do eixo 2, responsável por 25,4 % da variância total das amostras. As amostras dos participantes 1 e 2 estão dispersas ao longo deste eixo. A influência do tipo de *bracket* ou do quadrante dentário onde estão colocados parece variar com o participante. Veja-se o caso do participante 2 (pontos verdes) onde o *bracket* convencional localizado no 1º quadrante dentário (C,d) tem pouca

Resultados

colonização, contrariamente ao mesmo tipo de *bracket* no 2º quadrante dentário (C, e) e dos auto-ligáveis (A, d; A, e).

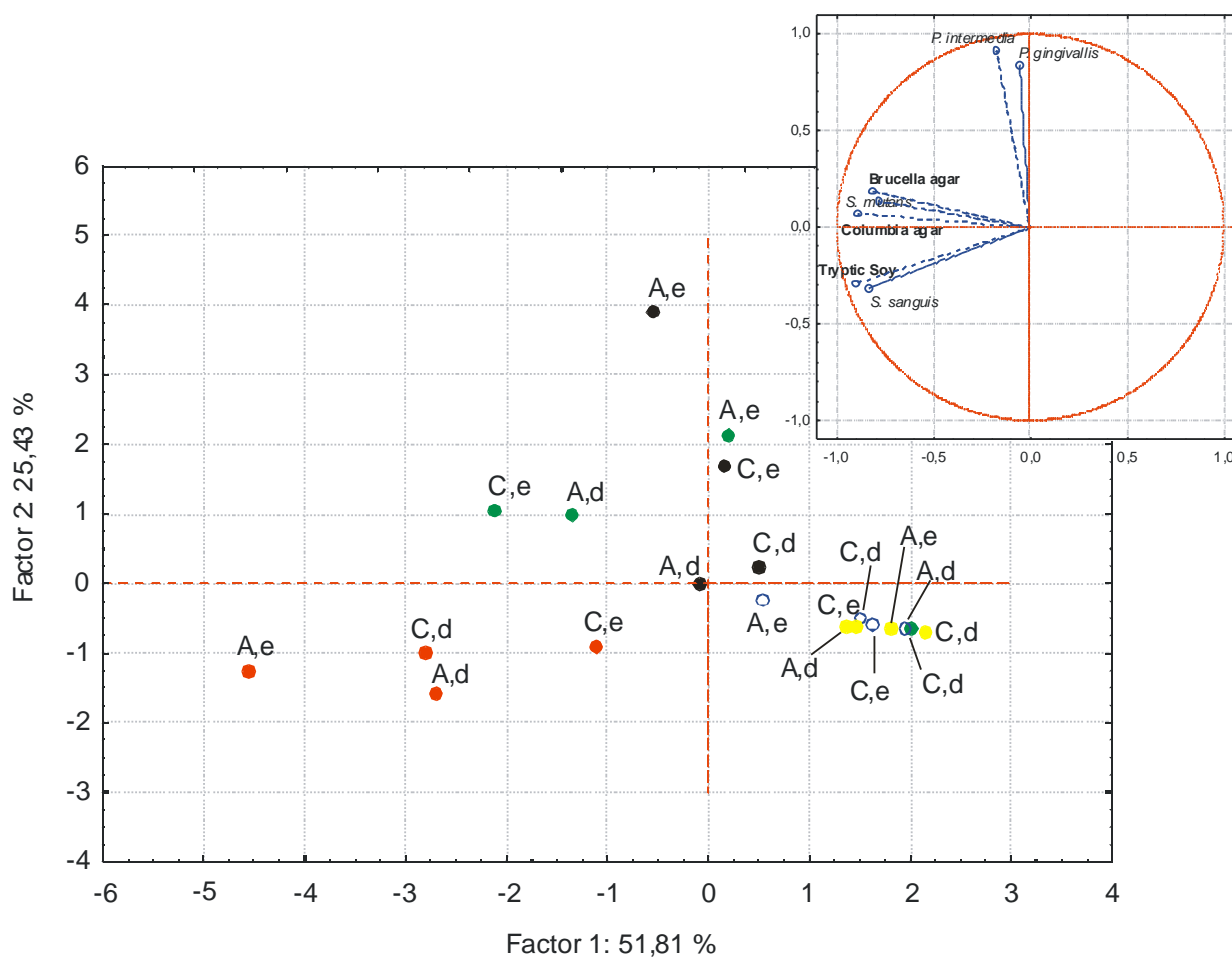


Gráfico 6 – Representação da análise das componentes principais da colonização microbiana nos *brackets* em cinco participantes. Pontos com a mesma cor pertencem ao mesmo participante (1 – negro; 2 – verde; 3 – amarelo; 4 – branco com limite azul; 5 – vermelho). C – *bracket* convencional; A – *bracket* auto-ligável; d – 1º quadrante dentário; e – 2º quadrante dentário.

DISCUSSÃO

O uso de aparelho ortodôntico fixo provoca desarmonia na homeostasia microbiana oral, na medida em que os brackets funcionam como retentores adicionais de restos alimentares, dificultando a higiene oral, sendo, desta forma, uma zona de excelência para a acumulação da placa bacteriana (3, 4, 6-9, 11, 12, 16, 31, 42). Verifica-se, pois, uma mudança não só quantitativa como qualitativa da placa bacteriana, principalmente a nível dos microrganismos patogênicos periodontais e cariogênicos (1, 6, 10, 14, 26). Como consequência, regista-se o aumento de lesões de manchas brancas (correspondentes à desmineralização do esmalte devido aos ácidos orgânicos produzidos pelos microrganismos acidogênicos), o aumento de inflamação gengival, o aumento da hemorragia pós-sondagem e a exacerbação de doença periodontal pré-existente (11, 14, 15, 18, 20, 24, 28, 29, 46).

Perante esta realidade, torna-se pertinente pensar se o tipo de *brackets* usados poderá ou não influenciar significativamente a colonização microbiana e, por conseguinte, ser levado em conta aquando do planeamento do tratamento ortodôntico.

Assim, para o estudo reunimos uma amostra de 5 pacientes (3 do sexo feminino e 2 do sexo masculino) da clínica de ortodontia da FMDUP em tratamento ortodôntico ativo. Convém ressaltar, porém, que esta foi a amostra possível face às limitações de orçamento e tempo disponível.

Todos os pacientes tinham idades compreendidas entre os 13 e os 27 anos, representando esta faixa etária a maioria da população ortodôntica de tratamento fase 2.

A seleção de pacientes teve vários pressupostos: (i) não terem tomado antibióticos nos três meses anteriores ao início do estudo, pois estes medicamentos, ao inibirem ou impedirem o crescimento bacteriano, favorecem o crescimento de microrganismos oportunistas, como por exemplo a *Candida albicans*, podendo-nos levar a resultados erróneos); (ii) não usarem colutório no mesmo período de tempo, uma vez que este altera quantitativamente e qualitativamente a constituição da placa bacteriana e (iii) possuírem um bom estado de saúde geral, sem tártaro, estando motivados para uma boa higiene oral. Estes critérios de inclusão foram estipulados de forma a uniformizar o máximo possível a amostra (5, 10, 22, 31).

Discussão

No que concerne à escolha dos dentes para a colagem dos brackets, optou-se pelos pré molares superiores, dado que os dentes posteriores são mais propensos à acumulação de placa bacteriana (5, 31). Não obstante, a acumulação de microrganismos pode variar com o local onde ocorre, podendo ser influenciada pela proximidade do *bracket* a ductos glandulares e ao sulco gengival (6).

De modo a que os dois tipos de *brackets* estivessem sujeitos às mesmas condições durante o período terapêutico, estes foram colados alternadamente, isto é, um *bracket* convencional nos dentes 15 e 24 e um *bracket* auto-ligável nos dentes 14 e 25.

Decidiu-se que a fase clínica do estudo tivesse a duração de 30 dias, uma vez que se fosse muito prolongada, os resultados poderiam ser afetados, pois a motivação para a higiene oral, a dieta e os hábitos dos participantes poderiam sofrer alterações. Para além disso, esta é a normal duração entre as consultas ortodônticas, prevenindo também o desconforto e a falta de comparência dos participantes no dia da recolha. Foi igualmente tido em conta o facto de este ser o período de tempo sugerido em muitos artigos com protocolos semelhantes ao presente estudo (27, 28, 31).

Para a identificação dos microrganismos, escolhemos meios de cultura seletivos, em detrimento de outras abordagens como a microscopia ótica de campo escuro, testes de imunofluorescência indireta, métodos moleculares como o uso de sondas de DNA ou a reação em cadeia da polimerase (PCR), dado serem a única opção viável para o orçamento disponível. Embora tenha sido equacionada a associação aos métodos de cultura dos testes bioquímicos, esta hipótese foi descartada por estes serem dispendiosos e morosos. Também é de realçar que, antes de realizar qualquer um dos outros testes referidos, teríamos sempre que fazer cultivo e contagem de colónias para validar resultados (3, 4, 27, 30).

Foram utilizados brackets auto-ligáveis da marca Damon[®] 3 MX (Ormco-Sybron Dental Specialties) por serem os disponíveis na clínica de ortodontia da FMDUP, facilitando assim o processo de obtenção dos mesmos. Como termo de comparação usaram-se os *brackets* convencionais Ortho[™] (Ormco-Sybron Dental Specialties). Estes são metálicos tal como os Damon[®] 3 MX (Ormco-Sybron Dental Specialties), o que diminui a possibilidade de o seu material influenciar os resultados. Brusca *et al.* (2006) ao estudarem a adesão de *S. mutans* e *C. albicans* em *brackets* metálicos, de cerâmica e de plástico, concluíram que os *brackets* estéticos,

por terem uma estrutura mais porosa e menos suave que os metálicos, apresentavam uma maior adesão por parte destes microrganismos (19).

A forma de ligação dos *brackets* também é um fator que influencia a colonização microbiana. Türkkahraman *et al.* (2005) ao compararem a adesão de *P. gingivalis* em *brackets* com ligadura elástica ou metálicas, verificaram que a adesão era superior nas elásticas, embora a diferença não fosse estatisticamente significativa (31). Por outro lado, Alves de Souza *et al.* (2006), e posteriormente Garcez *et al.* (2011), concluíram que o uso de ligaduras elásticas promovia uma retenção significativa de biofilme quando comparados com as metálicas (3, 22). Assim, no nosso trabalho, em todos os *brackets* convencionais usaram-se ligaduras elásticas para uniformizar a amostra e por serem as mais frequentemente utilizadas pelos ortodontistas (43). No entanto, contrariamente aos estudos publicados, optou-se por não colocar em cultura as ligaduras uma vez que, no dia-a-dia da prática clínica, as mesmas são alteradas frequentemente e, por conseguinte, o tempo decorrido após a sua renovação pode ter efeito sobre a fixação microbiana, já que o substrato é eliminado e um novo ciclo de formação de biofilme é iniciado (1, 6, 10). Adicionalmente, o objetivo inicial deste estudo foi analisar a influência que a forma dos brackets teria na colonização microbiana, não sendo avaliado o parâmetro forma de ligação.

Apesar de existirem diversos estudos que relacionam diferentes tipos de *brackets* com microrganismos cariogénicos, são poucos os que falam dos patogénicos periodontais, principalmente na placa supra-gengival (3, 10, 11). Este facto limitou a comparação dos resultados obtidos com o que já estaria estabelecido na literatura. Neste estudo abordámos não só os microrganismos cariogénicos, como também os microrganismos patogénicos periodontais na placa supra-gengival, com o objetivo de avaliar se a colonização por parte dos mesmos, em *brackets* auto-ligáveis e *brackets* convencionais de aparelhos ortodônticos fixos, difere nas mesmas condições de utilização e higiene oral.

Iniciando a discussão pelos microrganismos cariogénicos optou-se por estudar *S. mutans* e *S. sanguis*. Ambas as espécies são bactérias Gram positivas, aeróbias facultativas e em forma de coco. *S. mutans* pertence ao grupo das acidogénicas, sendo mesmo considerada, juntamente com o *S. sobrinus*, a espécie mais acidogénica presente no biofilme (39, 40). O facto de conseguir produzir ácido láctico a partir dos hidratos de carbono presentes no meio leva a que seja considerado o principal microrganismo responsável pela cárie dentária (3, 11, 12, 25, 36, 37, 39, 47). Trabalhos anteriores mostraram que os aparelhos ortodônticos fixos aumentam

Discussão

significativamente o número de *S. mutans* presente na placa bacteriana (31, 43). No entanto, Pandis *et al.* (2009) concluíram que as diferenças dos níveis salivares de *S. mutans* de pacientes em tratamento ortodôntico ativo, portadores de *brackets* auto-ligáveis e convencionais com ligaduras elásticas, não eram estatisticamente significativas (6).

No presente estudo, e para quase todos os grupos de *brackets*, observou-se uma prevalência, embora não significativa ($p > 0,05$), do *S. mutans* sobre *S. sanguis*, não havendo nenhuma situação com o mesmo nível de colonização por partes destes dois microrganismos. Papaioannou *et al.* (2007) concluíram que parece existir uma correlação negativa entre *S. sanguis* e *S. mutans* (11). Na literatura, *S. sanguis* é descrito como colonizador inicial da cavidade oral, registando-se um decréscimo no seu número após a colonização por parte do *S. mutans* (34). Tal poderá relacionar-se com o facto de estes dois microrganismos competirem por superfície dentária para a sua colonização (6, 34, 41).

No nosso trabalho, quer *S. mutans*, quer *S. sanguis* aumentaram, em média, nos *brackets* auto-ligáveis. Os valores de *S. mutans* foram de 6,9 log e 7,1 para os *brackets* convencionais e auto-ligáveis, respetivamente. Valores estes superiores aos obtidos por Garcez *et al.* (2011) que, ao comparem os *brackets* auto-ligáveis aos convencionais com ligaduras elásticas, a colonização por parte *S. mutans* foi maior nos *brackets* convencionais (6,09 log) do que nos auto-ligáveis (4,14 log) (3). No entanto, em ambos os estudos essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

No que respeita a *C. albicans* não foi encontrado na revisão bibliográfica especificação das diluições utilizadas para a colonização da mesma (19). Como o orçamento era escasso, não tivemos hipótese de pedir placas em excesso para fazer ensaio da fase laboratorial, cingindo-nos apenas à bibliografia. No primeiro dia de recolha optou-se por uma diluição 10^{-4} não obtendo nenhuma UFC nas placas de Petri. Desta forma, no segundo dia de recolha, escolheu-se a diluição 10^{-1} . Porém, contrariamente ao esperado, apenas se contaram 7 colónias numa placa de um *bracket*. Como tal estes resultados foram desprezados.

Seguindo com os patogénicos periodontais Lee *et al.* (2005) relataram diferenças significativas na prevalência de microrganismos patogénicos periodontais na placa sub-gengival de pacientes portadores de *brackets* convencionais (48). Assim, é de todo interessante estudar se a colonização nos *brackets* auto-ligáveis e convencionais difere na placa supra-gengival. Para o efeito, foram seleccionados os seguintes microrganismos: *Actinomyces* spp. (anaeróbios

facultativos, Gram positivo), *P. intermedia* (anaeróbico estrito, Gram negativo) e *P. gingivalis* (anaeróbico estrito Gram negativo). Todos estes microrganismos estão descritos na literatura como causadores de dano aos tecidos dentários de suporte (1, 21, 27, 30, 36, 42, 46, 49). Sallum *et al.* (2004) concluíram que a inflamação gengival estava associada à presença de patógenos periodontais tanto nas placas supra como sub-gengivais e que a remoção do aparelho ortodôntico junto com profilaxia e instruções de higiene oral reduzia em 50% o número de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (46).

Embora não tenha sido propósito do estudo analisar o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, foram encontradas algumas UFC de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no meio Brucela S. agar, em condições de anaerobiose nos participantes 1 e 2 que, por serem um número muito reduzido, não foram analisados estatisticamente. No entanto, deve-se dar especial atenção a este microrganismo, pois a sua presença é um fator de risco para a doença periodontal (30, 46).

As espécies *P. intermedia* e *P. gingivalis* são microrganismos encontrados na gengivite crônica, fazendo parte do “complexo laranja” e “complexo vermelho”, respectivamente (27, 30, 42). Estas bactérias são anaeróbicas estritas e a sua presença na placa supra-gengival deve-se à proteção mutualista entre as diferentes espécies do biofilme (1, 30, 34). Papaioannuou *et al.* (2012) concluíram que a película aderida, que se forma nos *brackets*, promovia a adesão microbiana por parte da *P. gingivalis* (9). Embora no nosso estudo não se tenha observado diferenças estatisticamente significativas entre os dois tipos de *brackets* na colonização por estas espécies, Van Gastel *et al.* (2009) referiram que os *brackets* Damon tinham uma contagem superior de UFC de *P. intermedia* quando comparados com Victory MBT[®], Micro-loc[®] e Generus[®] (1).

Ximenez-Fyvie *et al.* (2000) postularam que um aumento das proporções de *P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e de espécies de *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* e *Treponema* são mais prevalentes em ambas as amostras (supra e sub-gengivais) nos indivíduos com periodontite (42). No entanto, *P. gingivalis* e *P. intermedia* podem também ser encontradas em indivíduos saudáveis em menor número. Só foram encontrados estes microrganismos nos participantes 1 e 2, não significando necessariamente que estes indivíduos tenham doença periodontal ou que os restantes participantes não possuam estes microrganismos na placa supra gengival (30, 42). *P. gingivalis* e *P. intermedia* podem não ter crescido por estarem presentes em

Discussão

número muito baixo. Contudo, deve-se ter atenção ao acompanhamento periodontal dos participantes 1 e 2. Ao estudar futuramente estes microrganismos pode-se, adicionalmente, fazer um diagnóstico periodontal para ter a certeza se os mesmos já possuem doença periodontal.

Andrucioli *et al.* (2012), ao analisarem a contaminação microbiana em *brackets* metálicos com técnicas de hibridação de DNA-DNA, chegaram à conclusão que a contaminação por parte de *P. intermedia* era superior à de *P. gingivalis* (27). No atual estudo, embora não tenham existido diferenças estatisticamente significativas, a colonização por parte de *P. intermedia* foi sempre superior à do microrganismo do complexo vermelho. Como está descrito no estudo de Socransky *et al.* (1998), os microrganismos do complexo laranja colonizam primeiro o substrato do que os do complexo vermelho, sendo desta forma compreensível que os valores sejam diferentes e que haja um maior número do microrganismo correspondente ao primeiro complexo (50).

Tal como *S. sanguis*, *Actinomyces* spp., nomeadamente a espécie *Actinomyces viscosus*, são as bactérias que colonizam inicialmente a superfície do dente. Não obstante, também facilitam posteriormente, graças às suas fímbrias, a colonização da película por parte de outros microrganismos. Algumas espécies de *Actinomyces* podem causar dano nas estruturas de suporte periodontal, estando *A. viscosus* e *A. naeslundii* associados à gengivite crónica (30, 36).

Actinomyces spp. foram os únicos patogénicos periodontais encontrados em todos os participantes. Tal dever-se-á prender com o facto de estes microrganismos serem aeróbios facultativos vivendo melhor com o oxigénio presente na cavidade oral e colonizando primeiro a placa bacteriana do que *P. intermedia* e *P. gingivalis* (30, 34, 42). Esta análise está em sintonia com o estudo de Andrucioli *et al.*, (2012) em que também houve um número maior de *Actinomyces*, spp. do que das bactérias do complexo vermelho (27). Porém, no que concerne ao complexo laranja, verificou-se precisamente o contrário. Deve-se ter em conta, nesta comparação, que nós apenas estamos a analisar um microrganismo do complexo laranja e que o estudo de Andrucioli *et al.* (2012) foi realizado para a placa sub-gengival, onde as bactérias deste complexo tem um meio muito mais favorável para se multiplicarem (33).

Como a maior colonização, tanto para os microrganismos periodontais como para os cariogénicos, foi nos *brackets* auto-ligáveis e, na maioria dos estudos relatados, aconteceu o inverso, supõe-se que o uso da ligadura é um fator determinante na colonização. Uma vez que não se usaram as ligaduras elásticas, no local onde estas se alojavam nos respetivos *brackets*, não

houve colonização. Pelo contrário, os *brackets* auto-ligáveis estavam expostos por completo na cavidade oral, podendo toda a sua superfície ser colonizada. Ao analisar a distribuição do biofilme pelos *brackets*, por microscopia de varrimento, Van Gastel *et al* (2007) observaram que existiam irregularidades na interface entre as diferentes partes dos brackets auto-ligáveis (32).

O único parâmetro onde se obteve significado estatístico foi na variabilidade inter-participante. Vejamos a colonização de *P. gingivalis* e de *P. intermedia* entre os participantes 1 e 2 apresentaram 1650000 e 1750000 UFC, respetivamente, e os restantes, não apresentaram nenhuma UFC.

Quando vemos a colonização do total dos microrganismos, observamos que a média de UFC foi variável entre cada paciente, levantando a hipótese de que pode ter havido incumprimento do protocolo de higiene estabelecido, o que coloca em jogo a variável higiene oral. No entanto, o reduzido tamanho da amostra, o facto de os pacientes não serem todos da mesma idade nem do mesmo sexo, também pode ter influenciado os resultados, uma vez que estes são um fatores que podem influenciar a colonização microbiana oral (33).

Torna-se, então, relevante analisar parâmetros individuais que possam influenciar a colonização microbiana como, por exemplo, se o quadrante em que foi colado o *bracket* em cada individuo tem influência na colonização microbiana, uma vez que a eficácia da escovagem pode ser diferente nos dois quadrantes. Todos os participantes eram dextros e, analisando podemos comprovar que, de uma forma geral, existe um maior número de UFC no 2º quadrante em detrimento do 1º quadrante. No entanto, estas diferenças não tiveram significado estatístico. A variação participante está fortemente evidenciada na ACP. Nesta análise, também se pode observar um gradiente na colonização microbiana e do tipo de microrganismos, dependendo do tipo de *bracket* e do quadrante dentário (veja-se o caso dos participantes 1, 2 e 5).

Os nossos resultados parecem indicar que o fator variabilidade inter-participante tem maior influência na colonização microbiana do que a forma dos brackets. Porém, devemos ter em conta que a população é muito reduzida, o que acentua as variáveis individuais idade, sexo, tipo de alimentação e hábitos. Dentro do mesmo indivíduo, as variantes tipo de *bracket* e quadrante dentário onde foi colado são concordantes. Contudo, se se extrapolar para a população, obtemos uma grande variabilidade. Uma amostra maior poderia uniformizar este parâmetro e, provavelmente, obter-se significado estatístico.

Discussão

Embora não se tenham obtido resultados estatisticamente significativos, conseguimos chegar a uma tendência. Seria de todo o interesse, futuramente, com mais meios e tempo disponível, recuperar o protocolo aumentando o número da amostra e utilizando meios bioquímicos para confirmação dos resultados obtidos nas culturas. Poder-se-ia também, estudando os mesmos microrganismos, comparar uma maior variedade de marcas comerciais de *brackets* e mais materiais, alterando apenas o protocolo no ponto das ligaduras, para verificar até que ponto as mesmas interferem na colonização microbiana, tendo como base de comparação o presente estudo.

Adicionalmente, poder-se-iam usar técnicas moleculares, que permitem detetar tanto os microrganismos muito fastidiosos, como os pouco representados ou os não cultiváveis.

Peros et al. (2012) verificaram que a escovagem com pastas dentífricas contendo 0,23% de fluoreto de sódio mais de 3 vezes por dia, tinha um efeito antimicrobiano nos níveis salivares de *S. mutans* em pacientes com tratamento ortodôntico ativo (12). Por sua vez, Nelson-Filho et al. (2011) observaram que o uso de glutamato de clorohexidina a 0,12% reduzia os níveis de microrganismos Gram-negativos nos mesmos pacientes (28).

Em qualquer um dos dois estudos anteriormente sugeridos, poder-se-iam testar se estas substâncias têm um efeito antimicrobiano sob os microrganismos estudados e se a sua associação potencializa o efeito antimicrobiano, aferindo qual o melhor protocolo para a manutenção da higiene oral em pacientes em tratamento ortodôntico ativo com aparelho fixo.

CONCLUSÃO

Como não se obteve significância estatística entre a colonização microbiana nos *brackets* convencionais e os *brackets* auto-ligáveis conclui-se que o fator “forma dos *brackets*” não altera a colonização por parte do *S. Sanguis*, *S. mutans*, *Actinomyces* spp., *P. intermedia* e *P. gingivalis*.

O fator variabilidade inter-participante parece ter maior influência que o fator anterior, na colonização microbiana.

BIBLIOGRAFIA

1. van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Pauwels M, Coucke W, Carels C. Microbial adhesion on different bracket types in vitro. *The Angle orthodontist*. 2009;79(5):915-21.
2. Nelson-Filho P, Carpio-Horta KO, Andruccioli MC, Feres M, Bezerra da Silva RA, Garcia Paula-Silva FW, et al. Molecular detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* on metallic brackets by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2012;142(4):481-6.
3. Garcez AS, Suzuki SS, Ribeiro MS, Mada EY, Freitas AZ, Suzuki H. Biofilm retention by 3 methods of ligation on orthodontic brackets: a microbiologic and optical coherence tomography analysis. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2011;140(4):e193-8.
4. Pejda S, Varga ML, Milosevic SA, Mestrovic S, Slaj M, Repic D, et al. Clinical and microbiological parameters in patients with self-ligating and conventional brackets during early phase of orthodontic treatment. *The Angle orthodontist*. 2013;83(1):133-9.
5. Lindel ID, Elter C, Heuer W, Heidenblut T, Stiesch M, Schwestka-Polly R, et al. Comparative analysis of long-term biofilm formation on metal and ceramic brackets. *The Angle orthodontist*. 2011;81(5):907-14.
6. Pandis N, Papaioannou W, Kontou E, Nakou M, Makou M, Eliades T. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients with conventional and self-ligating brackets. *European journal of orthodontics*. 2010;32(1):94-9.
7. Ribeiro J., Bezerra R., Campos E., A. F. Avaliação da resistência adesiva e do padrão de descolagem de diferentes sistemas de colagem de braquetes associados à clorexidina. *Dental Press Ortodon Orto Facial*. 2008;13(4):117-26.
8. Sugar S, Guedes-Pinto A, Simionato M. Avaliação in vitro da influência do polimento superficial de resina acrílica para aparelhos ortodônticos na adesão e remoção de *Streptococcus mutans*. *Dental Press Ortodon Orto Facial*. 2005;10(1):94-107.
9. Papaioannou W, Panagopoulos A, Koletsi-Kounari H, Kontou E, Makou M. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* and Biofilm Formation on Different Types of Orthodontic Brackets. *International journal of dentistry*. 2012;2012:471380.
10. do Nascimento LE, Pithon MM, dos Santos RL, Freitas AO, Alviano DS, Nojima LI, et al. Colonization of *Streptococcus mutans* on esthetic brackets: self-ligating vs conventional. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2013;143(4 Suppl):S72-7.
11. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *The Angle orthodontist*. 2007;77(6):1090-5.
12. Peros K, Mestrovic S, Anic-Milosevic S, Rosin-Grget K, Slaj M. Antimicrobial effect of different brushing frequencies with fluoride toothpaste on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in children with fixed orthodontic appliances. *Korean journal of orthodontics*. 2012;42(5):263-9.
13. Attin R, Ilse A, Werner C, Wiegand A, Attin T. Antimicrobial effectiveness of a highly concentrated chlorhexidine varnish treatment in teenagers with fixed orthodontic appliances. *The Angle orthodontist*. 2006;76(6):1022-7.
14. Lee SJ, Kho HS, Lee SW, Yang WS. Experimental salivary pellicles on the surface of orthodontic materials. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2001;119(1):59-66.
15. Sukontapattipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *European journal of orthodontics*. 2001;23(5):475-84.
16. Lara-Carrillo E, Montiel-Bastida NM, Sanchez-Perez L, Alanis-Tavira J. Effect of orthodontic treatment on saliva, plaque and the levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. 2010;15(6):e924-9.
17. Knoernschild KL, Rogers HM, Lefebvre CA, Fortson WM, Schuster GS. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1999;115(6):634-9.

18. Basdra EK, Huber H, Komposch G. Fluoride released from orthodontic bonding agents alters the enamel surface and inhibits enamel demineralization in vitro. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1996;109(5):466-72.
19. Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *The Angle orthodontist*. 2007;77(2):331-6.
20. Poeta P, Igrejas G, Goncalves A, Martins E, Araujo C, Carvalho C, et al. Influence of oral hygiene in patients with fixed appliances in the oral carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* isolates. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009;108(4):557-64.
21. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *The Angle orthodontist*. 2002;72(4):338-43.
22. Alves de Souza R, Borges de Araujo Magnani MB, Nouer DF, Oliveira da Silva C, Klein MI, Sallum EA, et al. Periodontal and microbiologic evaluation of 2 methods of archwire ligation: ligature wires and elastomeric rings. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2008;134(4):506-12.
23. Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2008;133(6):882-8.
24. Ahn SJ, Lim BS, Yang HC, Chang YI. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. *The Angle orthodontist*. 2005;75(4):666-71.
25. Ahn SJ, Lee SJ, Lim BS, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2007;132(6):815-21.
26. Chapman JA, Roberts WE, Eckert GJ, Kula KS, Gonzalez-Cabezas C. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2010;138(2):188-94.
27. Andruccioli MC, Nelson-Filho P, Matsumoto MA, Saraiva MC, Feres M, de Figueiredo LC, et al. Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2012;141(1):24-9.
28. Nelson-Filho P, Valdez RM, Andruccioli MC, Saraiva MC, Feres M, Sorgi CA, et al. Gram-negative periodontal pathogens and bacterial endotoxin in metallic orthodontic brackets with or without an antimicrobial agent: an in-vivo study. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2011;140(6):e281-7.
29. Carvalhinho S, Costa AM, Coelho AC, Martins E, Sampaio A. Susceptibilities of *Candida albicans* mouth isolates to antifungal agents, essential oils and mouth rinses. *Mycopathologia*. 2012;174(1):69-76.
30. Eto F, Raslan S, Cortelli J. Características microbianas na saúde e doença periodontal. *Biociênc*. 2003;9(2):45-51.
31. Turkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *The Angle orthodontist*. 2005;75(2):231-6.
32. van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. Influence of bracket design on microbial and periodontal parameters in vivo. *Journal of clinical periodontology*. 2007;34(5):423-31.
33. Canzarra, Newman, Take, Klokkevoeld. *Canzarra's Clinical Periodontology*. 11 th ed
34. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;2(13):1599-607.
35. Rode Sde M, Gimenez X, Montoya VC, Gomez M, Blanc SL, Medina M, et al. Daily biofilm control and oral health: consensus on the epidemiological challenge--Latin American Advisory Panel. *Brazilian oral research*. 2012;26 Suppl 1:133-43.
36. Liljemark WF, Bloomquist C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1996;7(2):180-98.

Bibliografia

37. Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *Journal of bacteriology*. 2009;191(22):6804-11.
38. Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontic brackets. *Journal of dental research*. 2002;81(6):411-5.
39. Bitoun JP, Liao S, Yao X, Xie GG, Wen ZT. The redox-sensing regulator Rex modulates central carbon metabolism, stress tolerance response and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *PloS one*. 2012;7(9):e44766.
40. Peterson SN, Snesrud E, Liu J, Ong AC, Kilian M, Schork NJ, et al. The dental plaque microbiome in health and disease. *PloS one*. 2013;8(3):e58487.
41. Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infection and immunity*. 2000;68(7):4018-23.
42. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2000;27(9):648-57.
43. Fournier A, Payant L, Bouclin R. Adherence of *Streptococcus mutans* to orthodontic brackets. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1998;114(4):414-7.
44. Harradine N. Self-ligating brackets increase treatment efficiency. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2013;143(1):10-8, 1-9.
45. StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 9.1. www.statsoft.com; 2010
46. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Goncalves RB, Machion L, Wilson Sallum A, et al. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2004;126(3):363-6.
47. Mannaa A, Carlen A, Campus G, Lingstrom P. Supragingival plaque microbial analysis in reflection to caries experience. *BMC oral health*. 2013;13:5.
48. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, et al. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 2005;43(3):260-5.
49. Noiri Y, Li L, Ebisu S. The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *Journal of dental research*. 2001;80(10):1930-4.
50. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-44.

ANEXOS

ANEXO I

Apreciação da Comissão de Ética

Exma. Senhora

Estudante Susana Maria Pereira Cerqueira

Curso de Mestrado Integrado em

Medicina Dentária da

Faculdade de Medicina Dentária da U. Porto

8 0281

15 MAR. 2013

Assunto: Avaliação pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto do Plano de Atividades a realizar no âmbito da unidade curricular “Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica” do Mestrado Integrado em Medicina Dentária e cujo título é: “Colonização microbiana em dois tipos de brackets em pacientes com aparelho ortodôntico fixo”.

Informo V. Exa. que o projeto supra citado foi:

- **Aprovado** na reunião da Comissão de Ética do dia 06 de março de 2013.

Com os melhores cumprimentos,

O Presidente da Comissão de Ética



António Felino

(Professor Catedrático)

ANEXO II

Explicação do Estudo aos Participantes

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Monografia de Investigação

Explicação do Estudo

Tema

“Colonização microbiana em dois tipos de brackets em pacientes com aparelho ortodôntico fixo”

Objetivo

Avaliar se a colonização por microrganismos em *brackets* auto-ligáveis e *brackets* convencionais de aparelhos ortodônticos fixos é diferente nas mesmas condições de utilização e higiene oral.

Material e métodos

Os participantes serão cinco pacientes, em tratamento ortodôntico ativo, da clínica de ortodontia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Os pacientes estão conscientes dos riscos inerentes à ortodontia, tendo-lhes sido explicado, e por eles aprovado e assinado um consentimento informado quer para o tratamento ortodôntico, quer para a participação no presente estudo. Todo o processo foi devidamente explicado e alertou-se para o facto de, a qualquer momento, o paciente estar no seu pleno direito de

abandonar a investigação.

Previamente ao estudo foi explicado aos pacientes todo o processo, consciencializando-os para a sua participação voluntária, dando os mesmos a sua autorização com a assinatura de um consentimento informado.

Os critérios de inclusão a ter em conta serão: indivíduos que necessitem de recolagem de *brackets*, com um bom estado de saúde geral; que não tenham tomado antibióticos nem usado nos três meses anteriores ao início do estudo; sem tártaro e motivados para uma boa higiene oral.

Serão selecionados pacientes, segundo os critérios supra referidos, que necessitem de recolagem de *brackets* em 4 dentes da maxila. Na recolagem serão usados um *bracket* auto-ligável e um *bracket* convencional em cada quadrante da maxila. Após 30 dias de terapêutica, retirar-se-ão e proceder-se-á à sua substituição por equivalentes, sendo colocados em cultura para verificar a colonização microbiana.

Resultados/benefícios esperados

Se conseguirmos provar que existe diferença na colonização destes patogéneos periodontais, poderemos planear mais conscientemente o tratamento ortodôntico. Desta forma, passaremos a ter um novo elemento aquando do planeamento na escolha do tipo de *bracket* uma vez que poderemos estar a reduzir/eliminar um fator de risco periodontal durante o tratamento e, por conseguinte, reduzir o risco de doença periodontal, pois a sua progressão depende do equilíbrio entre o biofilme e a resposta imunológica e inflamatória de cada indivíduo, o que poderá constituir um grande benefício para a população ortodôntica.

Riscos/desconforto

Os pacientes a participar no estudo estão em tratamento ortodôntico ativo, ou seja, estão conscientes dos riscos inerentes à ortodontia, tendo-lhes sido explicado, e por eles aprovado e

assinado, um consentimento informado quer para o tratamento ortodôntico, quer para a participação voluntária no mesmo. Os riscos do uso de brackets são inerentes ao tratamento ortodôntico, sendo previamente aceites por cada paciente.

A técnica da remoção dos *brackets* é não invasiva, não deixa marcas permanentes e não acarreta custos adicionais para o paciente.

Faz parte de qualquer tratamento ortodôntico a recolagem de brackets, sendo os utilizados, no estudo, retirados e substituídos por outros equivalentes. A recolagem de brackets é benéfica para o paciente, na medida em que estes acumulam placa bacteriana e tártaro, reduzindo a eficácia dos mesmos no tratamento. O risco de desgaste do esmalte no ataque ácido e do polimento dos dentes é desprezível quando comparado com o benefício para o paciente. De salientar que esse procedimento será feito por um especialista em ortodontia, cujo o risco ainda é mais reduzido. Adicionalmente, os pacientes do estudo já necessitavam da recolagem de brackets, sendo que apenas iremos fazer uma recolagem extra.

Assim, o risco e desconforto para o paciente serão mínimos, não se interferindo com a qualidade do tratamento ortodôntico e do resultado final.

Caraterísticas éticas

- ☐ O presente estudo será realizado após o consentimento livre e informado de cada participante da amostra.
- ☐ A investigadora prontifica-se a esclarecer qualquer dúvida, referindo o âmbito do trabalho, garantindo a confidencialidade dos dados e o anonimato da pessoa alvo do estudo.
- ☐ Esta investigação não tem quaisquer fins financeiros ou económicos, sendo apenas meramente académica.

- ☐ Os participantes podem desistir a qualquer momento.
- ☐ Faz parte de qualquer tratamento ortodôntico a recolagem de *brackets* quando é necessário alterar a sua posição ou mesmo por se precisar de um torque diferente.
- ☐ Existem artigos publicados em revistas conceituadas como, por exemplo, a “Angle Orthodontist” (artigo enviado em anexo Gram-negative periodontal pathogens and bacterial endotoxin in metallic orthodontic brackets with or without an antimicrobial agent: An in-vivo study” publicado na revista American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics) que usaram metodologias semelhantes e que foram sujeitos ao parecer da Comissão de Ética.

_____, ____ de _____ de _____

Declaro que recebi, li e compreendi a explicação do estudo.

Assinatura do participante:

ANEXO III

Declaração de Consentimento Informado

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Considerando a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial

Título: «Colonização microbiana em dois tipos de brackets em pacientes com aparelho ortodôntico fixo »

_____(nome completo), compreendi a explicação que me foi fornecida, por escrito e verbalmente, acerca da investigação conduzida pela estudante Susana Maria Pereira Cerqueira, na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, para a qual é pedida a minha participação. Foi-me dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias, e para todas obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento de que, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsínquia, a informação que me foi prestada versou os objetivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto. Além disso, foi-me afirmado que tenho o direito de decidir livremente aceitar ou recusar a todo o tempo a minha participação no estudo. Sei que posso abandonar o estudo e que não terei que suportar qualquer penalização, nem quaisquer despesas pela participação neste estudo.

Foi-me dado todo o tempo de que necessitei para refletir sobre a proposta de participação.

Nestas circunstâncias, concordo com a minha participação neste projeto de investigação, tal como me foi apresentado pela investigadora responsável sabendo que a confidencialidade dos participantes e dos dados a eles referentes se encontram asseguradas.

Mais autorizo que os dados deste estudo sejam utilizados para outros trabalhos científicos, desde que irreversivelmente anonimizados.

Data __/__/__

Assinatura do/a participante:

Dados de contato:

A Investigadora: Susana Maria Pereira Cerqueira

Telemóvel: 964492890

E-mail: mimd08007@fmd.up.pt

Morada: Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-393
Porto

O orientador: Eugénio Joaquim Pereira Martins

E-mail: emartins@fmd.up.pt

Morada: Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto

O co- orientador: Ana Cristina Ramos Sampaio

E-mail: asampaio@utad.pt

Morada: Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto

ANEXO IV

Protocolo de Higiene Oral

Protocolo de higiene oral

1. Passar fio dentário nos espaços interproximais de todos os dentes.
2. Escovar os dentes usando a técnica de Bass modificada após cada refeição e antes de ir para a cama.
3. Uso de escovilhão interdentário
4. Não usar colutório

ANEXO V

Recibos do Material



Guia Transporte Nº 2384/2013

Data	Vencimento
23-05-2013	22-06-2013

Local de Entrega

Entidade: Rua Dr Manuel Pereira da Silva, 393
A/C: Paulo Dias
Morada:
Localidade: Porto
Requisitante:

Local de Facturação

Exmo.(s) Sr.(s)
Universidade Porto-Faculdade de Medicina Dentária
Rua Dr Manuel Pereira da Silva, 393

4200-393 Porto

Cliente	V/Nº Contrib.	Moeda	Desc. Cli.	Condição Pagamento	Requisição
C0770	501413197	EUR	0,00	Factura 30 dias	399/N02C13

Duplicado

Artigo	Descrição	Quant.	Pr. Unitário	Desc.	Iva	Total Líquido
Encomenda de Cliente Nº 1879/2013						
11024 Lote:051513025 Val:29-07-2013	Columbia CNA Agar (Sheep Blood 5%) (20 placas)	1,00	10,50	0,00	23	10,50
81003 Lote:051313032 Val:27-04-2015	Brucella Supplement (10 vials)	1,00	66,50	0,00	23	66,50

f2bS-Processado por Programa Certificado n.º 0030/AT

Quadro Resumo do IVA		
Taxa	Incidência	Valor IVA
23,00	77,00	17,71

Mercadoria/Serviços	77,00
Descontos Comerciais	0,00
Desconto Financeiro	0,00
Portes	0,00
Outros Serviços	0,00
IVA	17,71
Acerto	0,00
Total (EUR)	94,71

Local de Carga N/ Morada
Local de Descarga V/ Morada
Modo de Expedição Transportadora
Matricula
Carga:23-05-2013 12:24 Descarga: 23-05-2013 ____

Acrescem juros de mora à taxa comercial em vigor após data de vencimento

Só se aceitam reclamações até 72 horas após a entrega

Os produtos comercializados pela Frlabo destinam-se a investigação.

Esta factura pode ser paga por transferência bancária - NIB: 0035 0743 00012615130 72
Os artigos facturados foram colocados à disposição do adquirente nesta data

Frlabo II, Lda. - Rua Poça das Rãs, nº 109 - Miñeiros - 4475-265 MAIA
Tel.: 225 188 912 Fax: 225 188 914 - e-mail:info@frilabo.pt internet:www.frilabo.pt
NIF - 507958861 - Soc. P/Quotas C/Capital Social de 300.000€ - Cons. Reg. Comercial do Porto, nº 507958861

EMPRESA CERTIFICADA



Comercialização de Produtos e Equipamentos para Laboratório



Guia Transporte Nº 2461/2013

Data	Vencimento
28-05-2013	27-06-2013

Local de Entrega

Entidade: Rua Dr Manuel Pereira da Silva, 393
A/C: Paulo Dias
Morada:
Localidade: Porto
Requisitante:

Local de Facturação

Exmo.(s) Sr.(s)
Universidade Porto-Faculdade de Medicina Dentária
Rua Dr Manuel Pereira da Silva, 393
4200-393 Porto

Cliente	V/Nº Contrib.	Moeda	Desc. Cli.	Condição Pagamento	Requisição
C0770	501413197	EUR	0,00	Factura 30 dias	399/N02C13

Duplicado

Artigo	Descrição	Quant.	Pr. Unitário	Desc.	Iva	Total Líquido
Encomenda de Cliente Nº 1879/2013						
10037 Lote 040812022 Val 05-10-2013	Tryptic Soy Agar (20 placas)	1,00	9,50	0,00	23	9,50
24124 Lote 120812003 Val 03-12-2014	Thioglycollate Medium (10 vials)	3,00	18,75	0,00	23	56,25
610078 Lote 041213113 Val 03-09-2016	Brucella Agar Base, 500g	1,00	40,57	0,00	23	40,57

URaV-Processado por Programa Certificado n.º 0030/AT

Quadro Resumo do IVA		
Taxa	Incidência	Valor IVA
23,00	106,32	24,45

Mercadoria/Serviços	106,32
Descontos Comerciais	0,00
Desconto Financeiro	0,00
Portes	0,00
Outros Serviços	0,00
IVA	24,45
Acerto	0,00
Total (EUR)	130,77

Local de Carga: N/ Morada
Local de Descarga: V/ Morada
Modo de Expedição: Transportadora
Matricula:
Carga: 28-05-2013 12:45 Descarga: 28-05-2013

Acrescem juros de mora à taxa comercial em vigor após data de vencimento

Só se aceitam reclamações até 72 horas após a entrega

Os produtos comercializados pela Fritelabo destinam-se a investigação.

Esta factura pode ser paga por transferência bancária - NIB: 0035 0743 00012615130 72

Os artigos facturados foram colocados à disposição do adquirente nesta data:

Fritelabo II, Lda. - Rua Poço das Rãs, nº 109 - Miñho - 4475-266 MAIA
Tel: 225 186 912 Fax: 225 189 514 - e-mail: info@fritelabo.pt Internet: www.fritelabo.pt
NIF - 507956881 - Soc. P/Ductas C/Capital Social de 300.000€ - Cons. Reg. Comercial do Porto, nº 507956881

EMPRESA CERTIFICADA



Comercialização de Produtos e Equipamentos para Laboratório

**Guia Transporte Nº 2667/2013**

Data	Vencimento
06-06-2013	06-07-2013

Local de Entrega

Entidade: Rua Dr Manuel Pereira da Silva, 393
A/C: Paulo Dias
Morada:
Localidade: Porto
Requisitante:

Local de Facturação

Exmo.(s) Sr.(s)
Universidade Porto-Faculdade de Medicina Dentária
Rua Dr Manuel Pereira da Silva, 393

4200-393

Porto

Cliente	V/Nº Contrib.	Moeda	Desc. Cli.	Condição Pagamento	Requisição
C0770	501413197	EUR	0,00	Factura 30 dias	399/N02C13

Duplicado

Artigo	Descrição	Quant.	Pr. Unitário	Desc.	Iva	Total Líquido
Encomenda de Cliente Nº 1879/2013						
6.234 026	Tubos de ensaio 10x100mm (100unid)	1,00	8,50	0,00	23	8,50

B8Ar-Processado por Programa Certificado n.º 0030/AT

Quadro Resumo do IVA		
Taxa	Incidência	Valor IVA
23,00	8,50	1,96

Mercadoria/Serviços	8,50
Descontos Comerciais	0,00
Desconto Financeiro	0,00
Portes	0,00
Outros Serviços	0,00
IVA	1,96
Acerto	0,00
Total (EUR)	10,46

Local de Carga N/ Morada
Local de Descarga V/ Morada
Modo de Expedição Transportadora
Matricula
Carga 06-06-2013 11:59 Descarga: 06-06-2013 _____

Acréscem juros de mora à taxa comercial em vigor após data de vencimento

Só se aceitam reclamações até 72 horas após a entrega

Os produtos comercializados pela Frlabo destinam-se a investigação.

Esta factura pode ser paga por transferência bancária - NIB: 0035 0743 00012615130 72

Os artigos facturados foram colocados à disposição do adquirente nesta data

Frlabo II, Lda. - Rua Poça das Rãs, nº 109 - Mithérios - 4475-265 MAIA
Tel.: 225 188 912 - Fax: 225 188 914 - e-mail: info@frlabo.pt - internet: www.frlabo.pt
NIF - 507958861 - Soc. P/Quotas C/Capital Social de 300.000€ - Cons. Reg. Comercial do Porto, nº 507958861

EMPRESA CERTIFICADA



Comercialização de Produtos e Equipamentos para Laboratório



Guia Transporte Nº 2180/2013

Data	Vencimento
09-05-2013	08-06-2013

Local de Entrega

Entidade:
A/C: Paulo Dias
Morada:
Localidade:
Requisitante:

Local de Facturação

Exmo.(s) Sr.(s)
Universidade Porto-Faculdade de Medicina Dentária
Rua Dr Manuel Pereira da Silva, 393

4200-393 Porto

Cliente	V/Nº Contrib.	Moeda	Desc. Cli.	Condição Pagamento	Requisição
C0770	501413197	EUR	0,00	Factura 30 dias	399/N02C13

Duplicado

Artigo	Descrição	Quant.	Pr. Unitário	Desc.	Iva	Total Líquido
ECL Nº1879/2013 de 09-05-2013						
BR0055B Lote 18842201 Val:30-11-2014	Indicadores de Anaerobiose (100Un)	1,00	46,75	0,00	23	46,75
900095 Lote 455051 Val:01-04-2015	Placas de Petri Ø90mm, estéril R.Gosselin,660 und	1,00	47,50	0,00	23	47,50

VVBg-Processado por Programa Certificado n.º 0030/IAT

Quadro Resumo do IVA		
Taxa	Incidência	Valor IVA
23,00	94,25	21,68

Mercadoria/Serviços	94,25
Descontos Comerciais	0,00
Desconto Financeiro	0,00
Portes	0,00
Outros Serviços	0,00
IVA	21,68
Acerto	0,00
Total (EUR)	115,93

Local de Carga N/ Morada
Local de Descarga V/ Morada
Modo de Expedição Transportadora
Matricula
Carga09-05-2013 15:41 Descarga: 09-05-2013 _____

Acrescem juros de mora à taxa comercial em vigor após data de vencimento

Só se aceitam reclamações até 72 horas após a entrega

Os produtos comercializados pela Frilabo destinam-se a investigação.

Esta factura pode ser paga por transferência bancária - NIB: 0035 0743 00012615130 72

Os artigos facturados foram colocados à disposição do adquirente nesta data

Frilabo II, Lda. - Rua Poça das Rãs, nº 109 - Milheirós - 4475-265 MAIA
Tel: 225 188 912 Fax: 225 188 914 - e-mail: info@frilabo.pt Internet: www.frilabo.pt
NIF - 507958861 - Soc. P/Quotas C/Capital Social de 300.000€- Cons. Reg. Comercial do Porto, nº 507968861

EMPRESA CERTIFICADA



Comercialização de Produtos e Equipamentos para Laboratório



BIOGERM, S.A.
Rua da Estrada, 1060 Crestins
4470-500 Moreira, Maia
Telefone: 229 444 156/7
Fax: 229 444 159
info@biogerm.pt
www.biogerm.pt
Capital Social: 250 000,00€
N.º C.R.C. Maia / N.I.F.: 503 265 390

Rad 3301
Susana Maria Pereira Compinha
Hemograma
292



Exmo.(s) Sr.(s)
UP - Faculdade de Medicina Dentária
Rua Dr. Manuel Pereira da Silva

4200-393

PORTO

Factura N.º 722/2013 [FA]

Requisição	Moeda	Data	Vencimento
FMDUP N.º 397/ND2C13	EUR	14-05-2013	13-06-2013

Duplicado

V/N.º Contrib.	Desc. CII	Condição Pagamento	Desc. Fin.	Utilizador	Zona	Vend.	Pag.
501413197	0,00	Pagamento a 30 dias	0,00	MADALENA			1/1

Artigo	Descrição	Quant.	Un.	Pr. Unitário	Desc.	IVA	Total Líquido
MP020.1042	Brucela + H + K (90mm) - Cx. 20 Placas	1,00	UN	14,9900	0,00	23,00	14,99
MP020.1271	Chromo Candida- Cx. 20 Placas	1,00	UN	20,0000	0,00	23,00	20,00
23	Expedição/Deslocação	1,00	UN	10,0000	0,00	23,00	10,00
Compromisso: D000137944							

2013/5/11
Rui
Santos

Os bens/serviços facturados e colocados à disposição do adquirente em: 14-05-2013

Io por Programa Certificado n.º 0030A1

Os Artigos isentos de Iva estão ao abrigo do nº 2 do artº 9º do CIVA

Quadro Resumo do IVA		
Taxa	Incidência	Valor IVA
23,00	44,99	10,35

Mercadoria/Serviços	44,99
Descontos Comerciais	0,00
Desconto Financeiro	0,00
Portes	0,00
Outros Serviços	0,00
Adiantamentos	0,00
Ecovalor	0,00
IVA	10,35
Acerto	0,00
Total (EUR)	55,34

BIOGERM, S.A.
NIB: 0018 000331043698020 72- Santander Totta

A não liquidação desta fatura no prazo previsto poderá determinar o pagamento de juros de mora à taxa legal em vigor.

Local de Carga N/ Moreda
Local de Descarga V/ Moreda

Modo de Expedição V/ Conta

Carga 14-05-2013 09:48

a) Comercialização de meios de cultura preparados não incluído no âmbito da acreditação.

biOMÉRIEUX

Rad 3276
Susana Louie Aguiar
Prof. Eugénio

GUIA DE REMESSA

31483	MORADA DE ENTREGA
Faculdade de Medicina Dentária	
A/C Paulo Jorge Miranda Sousa Dias	
Rua Dr. Manuel Pereira Silva	
Paranhos	
4200 Porto	

31483	MORADA DE FACTURACAO
Faculdade de Medicina Dentária	
do Porto	
Rua Dr. Manuel Pereira Silva	
Paranhos	
4200-393 Porto	

Local de Carga: 2625-244 Vialonga

- Hora 18:24:47 Cont.Nr. 501413197

Guia de Remessa N°: 4277980

DATA: 09/05/13

ASSINALE ESTES DADOS NO SEU PAGAMENTO

Pag. 1

Enc. Cliente Nr. : FMDUP N°396/M02C13 de 09/05/13 Recebida em 09/05/13
N/Nr. Recomend. : 2698173/ 1 Entrega em 09/05/13
Condições de pagamento: Pagamento a 30 Dias Fim do Mês

ARMAGEM: Estrada Alfarocheira, 2625-244 Vialonga

Divisa : EUR

Ref:	Produto		QUANTIDADE			Preço Unitário	Valor
			A fornecer	Fornecida	Em falta		
45534	GENSAG ANAER		1			79,60	79,60
	1002154970	01/09/14		1			

2013/5/15
Rubi
Lopes

Processado por Computador

DESCONTOS

VALOR SUJEITO A IVA	% IVA	VALOR DE IVA
79,60	23,00	18,22

TOTAL A PAGAR EUR 97,91

bioMérieux Portugal, Lda.

Av. 25 de Abril de 1974, nº 25-3º, 2795-107 Linda a Vista
Tel: +351 21 435 2150 / Fax: +351 21 435 2157 - geral@biomerieux.pt
ALP: 501 534 172 - Matr. Cris. Reg. Com. Causa de registo: 501 534 172 / Cap. Soc. 1.012.900,00 €

ANEXO VI

Declaração de Autoria do Trabalho e Parecer do Orientador

